

氏 名	池田 淳史
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4719号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	マウスのCD49f陽性顎下腺細胞を用いた唾液腺再生に関する因子の探求
学位論文審査委員	山城 隆 教授                      高柴 正悟 教授 長塚 仁 教授

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

唾液は、口腔感染症発症の減少や創傷治癒の促進など口腔内環境を一定に保つ重要な働きを担っている。しかし、このような働きを持つ唾液の分泌を行う唾液腺は自己再生能力を持たないため、障害を一度受けると唾液分泌機能の回復は難しく、感染症発症の増加や、創傷治癒の遅延が生じる。近年、唾液腺と構造が似ている膵臓、肝臓、そして小腸は、連続する膵管、胆管、そして腸管陰窩から持続的な幹細胞供給を受けていることが報告された。また、ラット耳下腺の排泄導管を結紮すると腺房細胞のアポトーシスによって腺房が萎縮するが、結紮を開放すると導管の上皮細胞から腺房細胞前駆細胞が出現し、その増殖・分化により腺房が再生するという報告がある。さらに唾液腺中の導管上皮細胞にCD49fを発現している細胞が存在し、これが内胚葉系の様々な臓器の細胞へと分化する能力を持つことが報告された。

そこで、本研究では、マウスのCD49f陽性顎下腺細胞(以下、CD49f陽性細胞)が唾液腺の再生や修復に関与しているのではないかと考えた。そして、特にCD49f陽性細胞の性質を検討するために、マウスのCD49f陰性顎下腺細胞(以下、CD49f陰性細胞)と比較し、CD49f陽性細胞が多く産生する成長因子を解析し、その因子を特定することを目的とした。

#### 【材料および方法】

1. マウス顎下腺からの細胞単離：雄性5週齢のC57BL/6マウスから顎下腺を摘出し、酵素処理を行い、細胞を単離した。
2. フローサイトメトリー：単離した全細胞中のCD49f陽性細胞の割合をFluorescein-5-isothiocyanateで蛍光標識されたラット抗マウスCD49fモノクローナル抗体を用いて検出した。
3. 磁気ビーズ法を用いたCD49f陽性細胞の分離：CD49fモノクローナル抗体と磁気ビーズ法用ゴート抗ラットIgGマイクロビーズを反応させた後、auto MACS™の細胞分離プログラムを使って分離(POSSEL)し、CD49f陽性分画、陰性分画の細胞をそれぞれ回収した。
4. 分離した細胞の培養方法：分離したCD49f陽性細胞、陰性細胞を、角化細胞用無血清培地を用いて、37℃で5%CO<sub>2</sub>存在下で培養を行った。
5. 細胞形態の確認：培養したCD49f陽性、陰性細胞の形態の違いを、倒立顕微鏡を用いて観察した。
6. コロニー形成能(colony forming unit: CFU)の評価：8日間培養を行ったCD49f陽性細胞、陰性細胞のうち10個以上の細胞から形成されたコロニー数を倒立顕微鏡で計測し、3ウェルにおける全コロニー数の平均値をコロニー形成能として比較した。

7. 免疫蛍光染色法：CD49f と laminin の局在を免疫蛍光染色法と蛍光顕微鏡で検出した。
8. CD49f 陽性細胞の成長因子の網羅的解析：分離直後の CD49f 陽性細胞，陰性細胞から全 RNA を抽出し，Mouse Growth Factors RT<sup>2</sup> Profiler™ Polymerase Chain Reaction (PCR) Array を用いて，成長因子に関する mRNA 発現の網羅的な解析を行った。
9. 定量 PCR 法：分離直後の CD49f 陽性細胞，陰性細胞から標的遺伝子 [*Colony-stimulating factor 1*, *Inhibin beta B (Inhbb)*, *Transforming growth factor-alpha*, *Inhibin beta A (Inhba)*, *Inhibin alpha (Inha)*, *Follistatin*] を抽出し，遺伝子の増幅産物を作製し，その発現量を定量 PCR 法で検出した。
10. PCR 法：分離直後の CD49f 陽性細胞，陰性細胞から標的遺伝子 (*Inhba*, *Inhbb*, *Inha*, および *Follistatin*) を抽出し，遺伝子の増幅産物を作製し，その発現を PCR 法で検出した。
11. ウェスタンブロット法：細胞総タンパク質をアクリルアミドゲル電気泳動法で分画し，INHIBIN  $\beta_A$ , INHIBIN  $\beta_B$ , および FOLLISTATIN の発現量をウェスタンブロット法で比較した。
12. 統計処理：各実験系における有意差は，対応のない 2 群間の Student's *t*-test を用いて検定した。なお，*p* 値が 0.05 以下を有意差ありと判定した。

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験承認：OKU-2012375)

## 【結果】

1. CD49f 陽性細胞は全細胞中の 10.5 % 存在した。
2. CD49f 陽性細胞はコロニー状に増殖し，核 / 細胞質比は陰性細胞に比べ大きかった。
3. CD49f 陽性細胞のコロニー形成能は 11.5 倍であり，有意に高かった ( $p < 0.001$ )。
4. CD49f 陽性細胞内に laminin が発現していた。
5. mRNA では，CD49f 陽性，陰性細胞には *Inhba*, *Inhbb*, および *Follistatin* の発現があり，その発現量を比較すると，*Inhba* は 3.7 倍 ( $p < 0.01$ )，*Inhbb* は 5.0 倍 ( $p < 0.01$ )，および *Follistatin* ( $p < 0.05$ ) CD49f 陰性細胞に比べ，陽性細胞の *Inhba* ( $p < 0.01$ )，*Inhbb* ( $p < 0.01$ )，*Follistatin* は 1.5 倍 ( $p < 0.05$ ) と CD49f 陽性細胞で有意に多かった。
6. タンパク質では，CD49f 陰性細胞に比べ陽性細胞の方が INHIBIN  $\beta_A$  と INHIBIN  $\beta_B$  の発現量があり，その相対黒化度を比較すると，INHIBIN  $\beta_A$  は 3.4 倍 ( $p < 0.05$ )，INHIBIN  $\beta_B$  は 3.7 倍 ( $p < 0.05$ ) と，CD49f 陽性細胞で有意に多かった。

## 【考察と結論】

本研究結果から，マウス顎下腺から分離した CD49f 陽性細胞は自己複製能と多分化能を持ち，CD49f 陽性細胞が体性幹細胞の可能性があると考えた。また，分離直後の CD49f 陽性細胞は ACTIVIN を分泌しており，DNA 合成阻害作用によって細胞増殖が抑制されていると考えられる。一方，CD49f 陽性細胞を培養すると，培養上清中および細胞内に，分離直後では発現が無い FOLLISTATIN が発現していることを確認している（未発表データ）。

このことを一般的な唾液腺に置きかえると，摘出する直前の唾液腺は何も傷害を受けておらず修復や再生が必要な状態ではないため，CD49f 陽性細胞は，*follistatin* を発現せず，*activin* によって自身の無秩序な増殖を抑制している状態であると考えられる。一方，それが可能な状態では，適切な環境が整うと CD49f 陽性細胞が *follistatin* を発現し，*activin* に対する拮抗作用によって増殖した結果，再生や修復に必要なだけの細胞が供給されうることが意味している。このように，*activin-follistatin* 相互作用が唾液腺の再生や修復に関与していることが示唆された。今後，*activin-follistatin* 相互作用の研究を進めることで腺組織を有する唾液腺以外の多くの臓器における再生や修復を実現する有用な情報となるだろう。

本研究結果から，マウス顎下腺から分離した直後の CD49f 陽性顎下腺細胞は，CD49f 陰性顎下腺細胞に比べ *inhibin*  $\beta_A$  と *inhibin*  $\beta_B$  を多く分泌していることが結論づけられた。

## 学位論文審査結果の要旨

唾液は、口腔感染症発症の減少や創傷治癒の促進など口腔内環境を一定に保つ重要な働きを担っている。このような働きを持つ唾液の分泌を行う唾液腺は、外科的に切除した際に、一部は脱分化、増殖、腺構造への分化を伴う再生が行われる。しかし、肝臓などとは異なり、組織学的、形態学的に欠損部を完全には再生するに至らないため、唾液分泌機能の完全な回復は難しく、感染症発症の増加や、創傷治癒の遅延が生じる。近年、唾液腺と構造が似ている膵臓、肝臓、そして小腸は、連続する膵管、胆管、そして腸管腔窩から持続的な幹細胞供給を受けていることが報告された。また、ラット耳下腺の排泄導管を結紮すると腺房細胞のアポトーシスによって腺房が萎縮するが、結紮を開放すると導管の上皮細胞から腺房細胞前駆細胞が出現し、その増殖・分化により腺房が再生するという報告がある。これは、顎下腺の部分的な再生や恒常性の維持機構がはたらいていると考えられる。また、唾液腺中の導管上皮細胞に CD49f を発現している細胞が存在し、これが内胚葉系の様々な臓器の細胞へと分化する能力を持つという報告もある。

そこで、本研究では、マウスの CD49f 陽性顎下腺細胞（以下、CD49f 陽性細胞）が唾液腺の再生や恒常性の維持に関与しているのではないかと考えた。そして、特に CD49f 陽性細胞の性質を検討するために、マウスの CD49f 陰性顎下腺細胞（以下、CD49f 陰性細胞）と比較し、CD49f 陽性細胞が多く産生する成長因子を解析し、その因子を特定することを目的とした。

研究結果は、以下の内容であった。

分離した CD49f 陽性細胞は、

- 1) 唾液腺中の 10.5 % 存在した。
- 2) 自己複製能が高く、細胞内に laminin を発現していた。

分離直後の CD49f 陽性細胞は、CD49f 陰性細胞に比べ、

- 1) mRNA では、*Inhibin  $\beta_A$*  ( $p < 0.01$ )、*Inhibin  $\beta_B$*  ( $p < 0.01$ )、および *Follistatin* ( $p < 0.05$ ) を多く発現していた。また、*Inhibin  $\alpha$*  を発現していなかった。
- 2) タンパク質では、INHIBIN  $\beta_A$  と INHIBIN  $\beta_B$  (どちらも相対黒化度:  $p < 0.05$ ) を多く発現していた。

以上のことから、マウス顎下腺から分離した直後の CD49f 陽性顎下腺細胞は、CD49f 陰性顎下腺細胞に比べ *inhibin  $\beta_A$*  と *inhibin  $\beta_B$*  を多く分泌し、*follistatin* を分泌していないことが結論づけられた。このことは、摘出する直前の唾液腺は、組織修復や再生のための細胞増殖を活発に行う必要がなく、CD49f 陽性細胞が *activin* によって自身の無秩序な増殖を抑制し、恒常性を維持している状態と考えられる。逆に、組織修復や再生が必要な場合には、*follistatin* を発現し、*activin* を特異的に阻害することで細胞増殖を行うことが考えられる。このように、*activin-follistatin* 相互作用が唾液腺の再生や修復に関与していることが示唆された。

以上に基つき、審査委員会は本申請論文が博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。